

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **2003-194820**

(43)Date of publication of application : **09.07.2003**

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

G01N 21/27

G01N 33/483

(21)Application number : **2001-393576**

(71)Applicant : **FUJI PHOTO FILM CO LTD**

(22)Date of filing : **26.12.2001**

(72)Inventor : **YO HIROSHI
KAGEYAMA SHIGEKI
KOJIMA MASAYOSHI
SUDO YUKIO**

(54) SURFACE FOR BIOSENSOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a metallic surface, a fixing method, its manufacturing method, and an analytical method using these having an easy and highly reliable processing process in a means for fixing a physiological active material to the metallic surface without falling off while keeping activity as much as possible by reducing physical adsorption and denaturation by the interaction with a hydrophobic plane.

SOLUTION: This surface for a biosensor is composed of the metallic surface or a metallic film treated by a compound expressed by the following formula (1), and fixes the physiological active material by covalent bonding. $X-A(-Y)_m(-Z)_n \dots (1)$. [In the formula (1), X represents a functional group capable of forming the covalent bonding with the metallic surface, A represents a connecting group not less than a trivalence selected from a substituted or unsubstituted amino acid residue, an aliphatic group, an aromatic group, a heterocyclic group or a combination of these, Y represents a functional group capable of bonding to the physiological active material, and Z represents a functional group capable of improving performance of the sensor. m and n represent each an integer of 1 or more. Here, the compound expressed by the formula (1) is other than cysteine].

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-194820

(P2003-194820A)

(43) 公開日 平成15年7月9日(2003.7.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/543	5 9 5	G 0 1 N 33/543	5 9 5 2 G 0 4 5
	5 2 5		5 2 5 U 2 G 0 5 9
21/27		21/27	C
33/483		33/483	C

審査請求 未請求 請求項の数22 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2001-393576(P2001-393576)

(22) 出願日 平成13年12月26日(2001.12.26)

(71) 出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社

神奈川県南足柄市中沼210番地

(72) 発明者 楊 博

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フイルム株式会社内

(72) 発明者 景山 茂樹

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フイルム株式会社内

(74) 代理人 110000109

特許業務法人特許事務所サイクス (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオセンサー用表面

(57) 【要約】

【課題】 金属表面に生理活性物質を、ほとんどの分子が、物理吸着や疎水平面との相互作用による変性を軽減させ、できるだけ活性を保ったまま、脱落することなく固定化するための手段であって、処理過程が簡便で信頼性の高い、金属表面、固定化方法、その製造方法、およびそれらを用いる分析方法を提供すること。

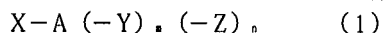
【解決手段】 下記式(1)で表される化合物で処理した金属表面又は金属膜から成る、生理活性物質を共有結合で固定化するためのバイオセンサー用表面。

$$X-A(-Y)_m(-Z)_n \quad (1)$$

[式(1)において、Xは金属表面と共有結合を形成しうる官能基を示し、Aは、置換又は未置換のアミノ酸残基、脂肪族基、芳香族基、ヘテロ環基またはこれらの組み合わせから選ばれる3価以上の連結基を示し、Yは生理活性物質と結合することができる官能基、Zはセンサーの性能を改善できる官能基を示す。m及びnは1以上の整数を示す。但し、式(1)で表される化合物はシステイン以外である。]

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記式(1)で表される化合物で処理した金属表面又は金属膜から成る、生理活性物質を共有結合で固定化するためのバイオセンサー用表面。



〔式(1)において、Xは金属表面と共有結合を形成しうる官能基を示し、Aは、置換又は未置換のアミノ酸残基、脂肪族基、芳香族基、ヘテロ環基またはこれらの組み合わせから選ばれる3個以上の連結基を示し、Yは生理活性物質と結合することができる官能基、Zはセンサーの性能を改善できる官能基を示す。m及びnは1以上の整数を示す。但し、式(1)で表される化合物はシステイン以外である。〕

【請求項2】 非電気化学的検出に使用される、請求項1に記載のバイオセンサー用表面。

【請求項3】 表面プラズモン共鳴分析に使用される、請求項1または2に記載のバイオセンサー用表面。

【請求項4】 式(1)において、Xが、チオール(-SH)、イソニトリル、ニトロ(-NO₂)、セレンオール(-SeH)、3価リン化合物、イソチオシアネート、キサンテート、チオカルバメート、ホスフィン、チオ酸(-CO₂H)、ジチオ酸(-C₂SSH)、非対称又は対称ジスルフィド[-SSA'(-Y')_m(-Z')_n]、スルフィド[-SA'(-Y')_m(-Z')_n]、ジセレニド[-SeSeA'(-Y')_m(-Z')_n]、またはセレニド[-SeA'(-Y')_m(-Z')_n]を示し、ここでA'は、置換又は未置換のアミノ酸残基、脂肪族基、芳香族基、ヘテロ環基またはこれらの組み合わせから選ばれる3個以上の連結基を示し、Y'は生理活性物質と結合することができる官能基、Z'はセンサーの性能を改善できる官能基を示し、m₁及びn₁は1以上の整数を示す、請求項1から3のいずれかに記載のバイオセンサー用表面。

【請求項5】 式(1)において、Yが、-OH、-COOH、-NH₂、-CHO、-NHNH₂、-NC₂S、エポキシ基、またはビニル基である、請求項1から4のいずれかに記載のバイオセンサー用表面。

【請求項6】 式(1)において、Zが、Yと結合させる生理活性物質またはその生理活性物質と相互作用するアナライトの変性または物理吸着を抑制できる官能基である、請求項1から5のいずれかに記載のバイオセンサー用表面。

【請求項7】 式(1)において、Zが、-OH、-COOH、-NH₂、-SO₃H、アルキルエステルまたはアリールエステル基、糖、核酸、蛋白質、または水溶性ポリマーである、請求項1から6のいずれかに記載のバイオセンサー用表面。

【請求項8】 式(1)で表される化合物が、システインのアミノ基またはカルボキシル基のどちらか片方または両方に、アミノ酸が縮合した長さがジペプチド以上の

システインを含むペプチドまたはそれらの誘導体である、請求項1から7のいずれかに記載のバイオセンサー用表面。

【請求項9】 式(1)で表される化合物が、請求項7のシステインを含むペプチドにおいてS-S結合で2量体のシスチン誘導体を形成したペプチドまたはそれらの誘導体である、請求項1から8のいずれかに記載のバイオセンサー用表面。

【請求項10】 式(1)で表される化合物が、還元型、または酸化型グルタチオン、またはそれらの誘導体である、請求項1から9のいずれかに記載のバイオセンサー用表面。

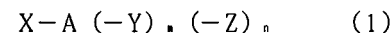
【請求項11】 請求項1から10のいずれかに記載のバイオセンサー用表面に生理活性物質を共有結合させて得られる、バイオセンサー用測定チップ。

【請求項12】 請求項1から10のいずれかに記載のバイオセンサー用表面又は請求項11に記載のバイオセンサー用測定チップと被験物質とを接触させる工程を含む、該バイオセンサー用表面に固定化されている生理活性物質と相互作用する物質を検出及び/又は測定する方法。

【請求項13】 バイオセンサー用表面に固定化されている生理活性物質と被験物質との相互作用を非電気化学的方法により検出及び/又は測定する、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 バイオセンサー用表面に固定化されている生理活性物質と被験物質との相互作用を表面プラズモン共鳴分析により検出及び/又は測定する、請求項12または13に記載の方法。

【請求項15】 金属表面又は金属膜を、少なくとも1種類の下記式(1)で表される化合物を含む混合液で処理する工程を含む、少なくとも1種類の下記式(1)で表される化合物を含む混合物で処理した金属表面又は金属膜から成る、生理活性物質を共有結合で固定化するためのバイオセンサー用表面の製造方法。



〔式(1)において、Xは金属表面と共有結合を形成しうる官能基を示し、Aは、置換又は未置換のアミノ酸残基、脂肪族基、芳香族基、ヘテロ環基またはこれらの組み合わせから選ばれる3個以上の連結基を示し、Yは生理活性物質と結合することができる官能基、Zはセンサーの性能を改善できる官能基を示す。m及びnは1以上の整数を示す。但し、式(1)で表される化合物はシステイン以外である。〕

【請求項16】 金属表面又は金属膜を、少なくとも1種類の下記式(1)で表される化合物を含む混合物で処理する工程；及び該式(1)で表される化合物に直接あるいは架橋性化合物またはヒドロゲルを介して生理活性物質を共有結合により結合させる工程を含む、金属表面又は金属膜に生理活性物質を固定化する方法。

$X-A(-Y)_m(-Z)_n$ (1)

〔式(1)において、Xは金属表面と共有結合を形成しうる官能基を示し、Aは、置換又は未置換のアミノ酸残基、脂肪族基、芳香族基、ヘテロ環基またはこれらの組み合わせから選ばれる3個以上の連結基を示し、Yは生理活性物質と結合することができる官能基、Zはセンサーの性能を改善できる官能基を示す。m及びnは1以上の整数を示す。但し、式(1)で表される化合物はシステイン以外である。〕

【請求項17】 式(1)において、Xが、チオール(−SH)、イソニトリル、ニトロ(−NO₂)、セレンノール(−SeH)、3価リン化合物、イソチオシアネート、キサンテート、チオカルバメート、ホスフィン、チオ酸(−COSH)、ジチオ酸(−CSSH)、非対称又は対称ジスルフィド[−SSA'(−Y')_m(−Z')_n]、スルフィド[−SA'(−Y')_m(−Z')_n]、ジセレニド[−SeSeA'(−Y')_m(−Z')_n]、またはセレニド[−SeA'(−Y')_m(−Z')_n]を示し、ここでA'は、置換又は未置換のアミノ酸残基、脂肪族基、芳香族基、ヘテロ環基またはこれらの組み合わせから選ばれる3個以上の連結基を示し、Y'は生理活性物質と結合することができる官能基、Z'はセンサーの性能を改善できる官能基を示し、m1及びn1は1以上の整数を示す、請求項15または16に記載の方法。

【請求項18】 式(1)において、Yが、−OH、−COOH、−NH₂、−CHO、−NHNH₂、−NC S、エポキシ基、またはビニル基である、請求項15から17のいずれかに記載の方法。

【請求項19】 式(1)において、Zが、−OH、−COOH、−NH₂、−SO₃H、アルキルエステルまたはアリールエステル基、糖、核酸、蛋白質、または水溶性ポリマーである、請求項15から18のいずれかに記載の方法。

【請求項20】 式(1)で表される化合物が、システインのアミノ基またはカルボキシル基のどちらか片方または両方に、アミノ酸が縮合した長さがジペプチド以上のシステインを含むペプチドまたはそれらの誘導体である、請求項15から19のいずれかに記載の方法。

【請求項21】 式(1)で表される化合物が、請求項20のシステインを含むペプチドにおいてS−S結合で2量体を形成したシスチン誘導体を形成したペプチド、またはそれらの誘導体である、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 式(1)で表される化合物が、還元型、または酸化型グルタチオン、またはそれらの誘導体である、請求項15から21のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、生理活性物質と結

合することができるリンカー化合物で処理した金属表面又は金属膜からなるバイオセンサー用表面、該バイオセンサー用表面に生理活性物質を固定化したバイオセンサー用測定チップ、それらの製造方法、並びに、それらを用いた測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 現在、臨床検査等で免疫反応など分子間相互作用を利用した測定が数多く行われているが、従来法では煩雑な操作や標識物質を必要とするため、標識物質を必要とすることなく、測定物質の結合量変化を高感度に検出することのできるいくつかの技術が使用されている。例えば、表面プラズモン共鳴(SPR)測定技術、水晶発振子マイクロバランス(QCM)測定技術、金のコロイド粒子から超微粒子までの機能化表面を使用した測定技術である。SPR測定技術はチップの金属膜に接する有機機能膜近傍の屈折率変化を反射光波長のピークシフト又は一定波長における反射光量の変化を測定して求めることにより、表面近傍に起こる吸着及び脱着を検知する方法である。QCM測定技術は水晶発振子の金電極(デバイス)上の物質の吸脱着による発振子の振動数変化から、ngレベルで吸脱着質量を検出できる技術である。また、金の超微粒子(nmレベル)表面を機能化させて、その上に生理活性物質を固定して、生理活性物質間の特異認識反応を行わせることによって、金微粒子の沈降、配列から生体関連物質の検出ができる。

【0003】 以上のすべての技術においては、いずれの場合、生理活性物質を固定化する表面が重要である。以下、当技術分野で最も使われている表面プラズモン共鳴(SPR)を例として、説明する。

【0004】 一般に使用される測定チップは、透明基板(例えば、ガラス)、蒸着された金属膜、及びその上に生理活性物質を固定化できる官能基を有する薄膜からなり、その官能基を介し、金属表面に生理活性物質を固定化する。該生理活性物質とアナライト間の特異的な結合反応を測定することによって、生体分子間の相互作用を分析する。

【0005】 生理活性物質を固定化できる官能基を有する薄膜としては、金属と結合する官能基、鎖長の原子数が10以上のリンカー、及び生理活性物質と結合できる官能基を有する化合物を用いて、生理活性物質を固定化した測定チップが報告されている(特許第2815120号を参照)。

【0006】 しかしながら、リガンド(或いはアナライト)と有機膜表面の物理的吸着による非特異結合はチップの感度に悪い影響を及ぼす。即ち、生理活性物質が金属膜に固定化される際、目的の共有結合だけで固定化されるだけでなく、部分的に物理吸着でも生理活性物質は固定化される。蛋白質が金表面へ物理吸着で固定化されると、蛋白質は変性しやすい。また、共有結合での固定化に比較し、測定中に脱落するという問題がある。これ

らの問題は、結果的に、測定感度低下と再現性の劣化をもたらすため、不要な物理吸着を無くすための施策が望まれていた。

【0007】この課題を解決するためにいくつかの方法が採用されている。例えば、金属表面にリンカーを介し、親水性のハイドロゲルを固定化することで、物理吸着を抑制する方法も使用されてきた（特許第2815120号、米国特許第5436161号、特開平8-193948号公報を参照）。しかしながら、この方法は、ハイドロゲルの固定化が容易ではないため、様々なユーザーが自分たちの目的に合わせ表面処理を行うには適さなかった。さらに、ハイドロゲルを用いた場合、細胞などの高分子量の分析物（アナライト）を測定する場合、アナライトがマトリックスの隙間に侵入できない問題点があった。

【0008】一方、生理活性物質の物理吸着による非特異結合を軽減する方法として、プラスチックプレートを用いる免疫化学分析では、ウシ血清アルブミンなどによるいわゆるブロッキングが用いられてきた。また、金属表面を用いる分析法では、末端をチオール化したDNAを金属膜に固定化し、SPRを用いるDNAセンサーを作製する場合、6-ヒドロキシー-1-ヘプタンチオールを添加することによって、非特異的吸着が起らず、高感度で目的DNAを検出できることが報告されている

（米国特許第5942397号、及びJ. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 8916-8920を参照）。また、チオール化したビオチンと11-ヒドロキシー-1-ウンデカンチオールとを同時混合し、ストレプトビジンとの反応を非特異結合を抑制して検出することが報告されている（J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 6469-6478を参照）。

【0009】しかしながら、これらの方法は次の問題点もある。すなわち、これらは、分析対象物（アナライト）の非特異的吸着を抑制を目的にしており、固定化される生理活性物質の一部が物理吸着することによる生理活性物質の不必要な変性や脱落に関する問題点に対する解決法を与えるものではない。また、金属表面に直接固定化できる生理活性物質の誘導体の合成は容易ではない。また、これらの2成分を用いるSAMは、その作製において、均一性や再現性に問題があるため、単一成分で、生理活性物質の変性や物理吸着が少ない金属表面が望まれている。

【0010】また、1成分のSAMとして、短鎖の化合物を使用した例が示されている（Biosensor & Bioelectronics, 1998, 13, 1213-1225）。その例には、システインが含まれ、そのカルボキシル基を使用して免疫グロブリンを共有結合することで、SAMのない金属表面に直接物理吸着で固定化することより、安定な固定化を達成した。しかしながら、この報告では、システインに存在する親水性の官能基がタンパク質変性を抑制する効果について言及されていない。これらの問題点は、表面プラズモン共鳴（SPR）技術だけでなく、QCM技術及び

金超微粒子技術にも同様に存在している。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、上記の従来技術の問題点を解消することである。即ち、本発明は、金属表面に生理活性物質を、ほとんどの分子が、物理吸着や疎水平面との相互作用による変性を軽減させ、できるだけ活性を保ったまま、脱落することなく固定化するための手段であって、処理過程が簡便で信頼性の高い、金属表面、固定化方法、その製造方法、およびそれらを用いる分析方法を提供することを解決すべき課題とした。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、生理活性物質を金属表面に固定化する際に、生理活性物質を共有結合を介して結合するための官能基とともに、同一分子内に生理活性物質の物理吸着や変性を抑制する官能基を有する化合物で金属表面を処理し、その後に生理活性物質を反応させることにより、生理活性物質を安定的に共有結合を介して金属表面に固定化できることを見出し、本発明を完成するに至った。また、この表面を使用して作製したバイオセンサーチップも、従来の問題点を軽減することが見出された。特に、システインまたはシスチンを含むペプチドまたはその誘導体で金属表面を処理した表面を用いると、システイン単独で処理した表面よりも、簡単に再現よく、生理活性物質を安定的に共有結合を介して金属表面に固定化できることを見出された。

【0013】即ち、本発明によれば、少なくとも下記式

(1) で表される化合物で処理した金属表面又は金属膜から成る、生理活性物質を共有結合で固定化するためのバイオセンサー用表面が提供される。

$X-A(-Y)_m(-Z)_n$ (1)

〔式(1)において、Xは金属表面と共有結合を形成する官能基を示し、Aは、置換又は未置換のアミノ酸残基、脂肪族基、芳香族基、ヘテロ環基またはこれらの組み合わせから選ばれる3個以上の連結基を示し、Yは生理活性物質と結合することができる官能基、Zはセンサーの性能を改善できる官能基を示す。m及びnは1以上の整数を示す。但し、式(1)で表される化合物はシステイン以外である。〕

【0014】本発明のバイオセンサー用表面は、好ましくは非電気化学的検出に使用され、特に好ましくは、表面プラズモン共鳴分析に使用される。好ましくは、式(1)において、Xが、チオール(-SH)、イソニトリル、ニトロ(-NO₂)、セレノール(-SeH)、3価リン化合物、イソチオシアネート、キサンテート、チオカルバメート、ホスフィン、チオ酸(-CO₂SH)、ジチオ酸(-C₂SSH)、非対称又は対称ジスルフィド[-SSA¹(-Y¹)_m(-Z¹)_n]、スルフィド[-SA¹(-Y¹)_m(-Z¹)_n]、ジセレニド

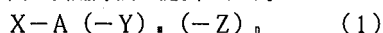
$[-SeSeA'(-Y')_m(-Z')_n]$ 、またはセレンド $[-SeA'(-Y')_m(-Z')_n]$ を示し、ここで A' は、置換又は未置換のアミノ酸残基、脂肪族基、芳香族基、ヘテロ環基またはこれらの組み合わせから選ばれる3個以上の連結基を示し、 Y' は生理活性物質と結合することができる官能基、 Z' はセンサーの性能を改善できる官能基を示し、 m 及び n は1以上の整数を示す。

【0015】好ましくは、式(1)において、 Y は、 $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CHO$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-NCS$ 、エポキシ基、またはビニル基である。好ましくは、式(1)において、 Z は、 Y と結合させる生理活性物質またはその生理活性物質と相互作用するアナライトの変性または物理吸着を抑制できる官能基である。好ましくは、式(1)において、 Z は、 $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-SO_3H$ 、アルキルエステルまたはアリールエステル、糖、核酸、蛋白質、または水溶性ポリマーである。

【0016】好ましくは、式(1)で表される化合物は、システインのアミノ基またはカルボキシル基のどちらか片方または両方に、アミノ酸が縮合した長さがジペプチド以上のシステインを含むペプチドまたはそれらの誘導体、または、それらのシステインを含むペプチドが、 $S-S$ 結合で2量体のシスチン誘導体を形成したペプチドまたはそれらの誘導体であるさらに好ましくは、式(1)で表される化合物は、還元型、または酸化型グルタチオン、またはそれらの誘導体である

【0017】本発明の別の側面によれば、上記した本発明のバイオセンサー用表面に生理活性物質を共有結合させて得られる、バイオセンサー用測定チップが提供される。本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のバイオセンサー用表面又はバイオセンサー用測定チップと被験物質とを接触させる工程を含む、該バイオセンサー用表面に固定化されている生理活性物質と相互作用する物質を検出及び／又は測定する方法が提供される。好ましくは、バイオセンサー用表面に固定化されている生理活性物質と被験物質との相互作用は非電気化学的方法により検出及び／又は測定され、特に好ましくは、バイオセンサー用表面に固定化されている生理活性物質と被験物質との相互作用は表面プラズモン共鳴分析により検出及び／又は測定される。

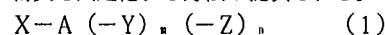
【0018】本発明のさらに別の側面によれば、金属表面又は金属膜を、少なくとも1種類の下記式(1)で表される化合物を含む混合物で処理する工程を含む、少なくとも1種類の下記式(1)で表される化合物を含む混合物で処理した金属表面又は金属膜から成る、生理活性物質を共有結合で固定化するためのバイオセンサー用表面の製造方法が提供される。



[式(1)において、 X は金属表面と共有結合を形成し

うる官能基を示し、 A は、置換又は未置換のアミノ酸残基、脂肪族基、芳香族基、ヘテロ環基またはこれらの組み合わせから選ばれる3個以上の連結基を示し、 Y は生理活性物質と結合することができる官能基、 Z はセンサーの性能を改善できる官能基を示す。 m 及び n は1以上の整数を示す。但し、式(1)で表される化合物はシステイン以外である。]

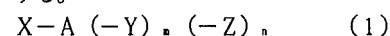
【0019】本発明のさらに別の側面によれば、金属表面又は金属膜を、少なくとも1種類の下記式(1)で表される化合物を含む混合物で処理する工程；及び該式(1)で表される化合物に直接あるいは架橋性化合物またはヒドロゲルを介して生理活性物質を共有結合により結合させる工程を含む、金属表面又は金属膜に生理活性物質を固定化する方法が提供される。



[式(1)において、 X は金属表面と共有結合を形成しうる官能基を示し、 A は、置換又は未置換のアミノ酸残基、脂肪族基、芳香族基、ヘテロ環基またはこれらの組み合わせから選ばれる3個以上の連結基を示し、 Y は生理活性物質と結合することができる官能基、 Z はセンサーの性能を改善できる官能基を示す。 m 及び n は1以上の整数を示す。但し、式(1)で表される化合物はシステイン以外である。]

【0020】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。本発明のバイオセンサー用表面は、少なくとも1種類の下記式(1)で表される化合物を含む混合物で処理した金属表面又は金属膜から成ることを特徴とする。



[式(1)において、 X は金属表面と共有結合を形成しうる官能基を示し、 A は、置換又は未置換のアミノ酸残基、脂肪族基、芳香族基、ヘテロ環基またはこれらの組み合わせから選ばれる3個以上の連結基を示し、 Y は生理活性物質と結合することができる官能基、 Z はセンサーの性能を改善できる官能基を示す。 m 及び n は1以上の整数を示す。但し、式(1)で表される化合物はシステイン以外である。]

【0021】本発明のバイオセンサー用表面は、金属表面又は金属膜を本明細書に定義する少なくとも1種類の下記式(1)で表される化合物を含む混合物で処理することにより製造される。金属膜は好ましくは基板上に配置されている。ここで、「基板上に配置される」とは、金属膜が基板上に直接接触するように配置されている場合のほか、金属膜が基板に直接接触することなく、他の層を介して配置されている場合をも含む意味である。

【0022】金属膜が基板上に配置されている場合、本発明のバイオセンサー用測定チップは、基板と、基板上に形成された金属膜と、金属膜上に形成されたリンカー層(一般式Iで示される化合物から成る)とを有する。

【0023】本発明で使用することができる基板としては例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用を考えた場合、固定化法に使用されるものであればどのようなものでもよく、一般的にはガラス、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネートなどのレーザー光に対して透明な材料からなるものが使用できる。このような基板は、好ましくは、偏光に対して異方性を示さずかつ加工性の優れた材料が望ましい。基板の厚さは特に限定されないが、通常0.1～20mm程度である。

【0024】本発明のバイオセンサー用測定チップにおける金属膜としては、例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用を考えた場合、表面プラズモン共鳴が生じ得るようなものであれば特に限定されない。この金属膜に使用することのできる金属の種類としては、金、銀、銅、アルミニウム、白金等が挙げられ、それらを単独又は組み合わせて使用することができる。また、上記基板への付着性を考慮して、基板と金、銀等からなる層との間にクロム等からなる介在層を設けてもよい。

【0025】金属膜の膜厚は任意であるが、例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用を考えた場合、100～2000オングストロームであるのが好ましく、特に200～600オングストロームであるのが好ましい。3000オングストロームを超えると、媒質の表面プラズモン現象を十分検出することができない。また、クロム等からなる介在層を設ける場合、その介在層の厚さは、5～50オングストロームであるのが好ましい。金属膜の形成は常法によって行えばよく、例えば、スパッタ法、蒸着法、イオンプレーティング法、電気めっき法、無電解めっき法等によって行うことができる。

【0026】次に本発明で用いる式(1)で表される化合物について説明する。式(1)において、Xは金属表面と共有結合を形成しうる官能基であればその種類は特に限定されない。好ましくは、Xは、チオール(—SH)、イソニトリル、ニトロ(—NO₂)、セレノール(—SeH)、3価リン化合物、イソチオシアネート、キサンテート、チオカルバメート、ホスフィン、チオ酸(—COSH)、ジチオ酸(—CSSH)、非対称又は対称ジスルフィド[—SSA¹(—Y¹)_m(—Z¹)_n]、スルフィド[—SA¹(—Y¹)_m(—Z¹)_n]、ジセレニド[—SeSeA¹(—Y¹)_m(—Z¹)_n]、またはセレニド[—SeA¹(—Y¹)_m(—Z¹)_n]を示し、ここでA¹は、置換又は未置換のアミノ酸残基、脂肪族基、芳香族基、ヘテロ環基またはこれらの組み合わせから選ばれる3個以上の連結基を示し、Y¹は生理活性物質と結合することができる官能基、Z¹はセンサーの性能を改善できる官能基を示し、m1及びn1は1以上の整数を示す。

【0027】特に好ましくは、Xは、チオール(—SH)、あるいは非対称又は対称ジスルフィド[—SSA¹(—Y¹)_m(—Z¹)_n]であり、最も好ましくは、

Xは、チオール(—SH)である

【0028】式(1)において、A及びA¹は、置換又は未置換のアミノ酸、脂肪族基、芳香族基、ヘテロ環基またはこれらの組み合わせから選ばれる3個以上の連結基を示す。A及びA¹は、同一の基でも異なる基でもよい。A及びA¹は炭化水素基であることが好ましい。また、A及びA¹が示す3個以上の連結基は好ましくは、鎖長の原子数が10以下であり、より好ましくは鎖長の原子数が8以下である。

【0029】アミノ酸残基のアミノ酸としては、金属と直接結合するシステインの他、グリシン、アラニンなどが挙げられ、それらが重合して形成されるペプチドでもよい。脂肪族基としては、アルキレン基、アルケニレン基又はアルキニレン基等を包含し、鎖の形態は直鎖、分岐鎖、環状鎖又はこれらの組み合わせの何れでもよい。脂肪族基としてはアルキレン基が特に好ましく、最も好ましくは直鎖のアルキレン基である。脂肪族基の長さは特に限定されないが、例えば、炭素数1～20であり、より好ましくは炭素数1～10程度であり、特に好ましくは炭素数2～10程度である。芳香族基としては、アリーレン基などが挙げられ、具体的にはフェニレン基、ナフチレン基などが挙げられる。

【0030】ヘテロ環としては、窒素原子、酸素原子又は硫黄原子から選ばれる1種以上のヘテロ原子を1個以上含む5または7員の飽和または不飽和の単環または縮合環などが挙げられ、具体的には、ピリジン、キノリン、イソキノリン、ピリミジン、ピラジン、ピリダジン、フタラジン、トリアジン、フラン、チオフェン、ピロール、オキサゾール、ベンゾオキサゾール、チアゾール、ベンゾチアゾール、イミダゾール、ベンゾイミダゾール、チアジアゾール、トリアゾール等が挙げられる。ヘテロ環基とは上記したようなヘテロ環から誘導される2価の基を言う。

【0031】A及びA¹で表される3個以上の連結基は、上記したような脂肪族基、芳香族基又はヘテロ環基の組み合わせから構成されるものでもよい。A及びA¹で表される連結基の価数は3個以上であればその上限は特に限定されないが、好ましくは5個以下、より好ましくは4個以下であり、最も好ましくは3個である。A及びA¹で表される連結基の価数が4個以上の場合、Aは、2以上の—Yで表される置換基及び/または2以上の—Zで表される置換基を有することができる。

【0032】式(1)において、Yは生理活性物質と結合することができる官能基を示し、その官能基の種類は固定化する生理活性物質の種類に応じて適宜選択することができる。一般的には、Yは、—OH、—COOH、—NH₂、—CHO、—NHNH₂、—NCS、エポキシ基、またはビニル基などである。

【0033】式(1)において、Zはセンサーの性能を改善できる官能基を示し、例えば、生理活性物質または

その生理活性物質と相互作用するアナライトの変性または金属表面への物理吸着を抑制できる官能基などが挙げられる。このような官能基は、Yで示される生理活性物質と結合することができる官能基とは異なる基として、固定化する生理活性物質の種類に応じて適宜選択することができる。一般的には、Yは、 $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-SO_3H$ 、アルキルエステルまたはアリールエステル、糖、核酸、蛋白質、または水溶性ポリマー（例えば、ポリオキシエチレンなどの親水性基）である。

【0034】式(1)において、m、n、m1、n1はそれぞれ独立に、1以上の整数を示し、好ましくは1から10を示し、より好ましくは1から5を示し、さらに好ましくは1から2を示し、最も好ましくは1である。

【0035】式(1)で表される化合物の官能基Y、Zの分子内の数は、生理活性物質の種類、実験条件などに依りて適宜選択することができる。一般的には、式

(1)のYで表される官能基：式(1)のZで表される官能基の分子内におけるモル比は1：10から10：1の範囲内であり、好ましくは1：5から5：1の範囲内であり、特に好ましくは1：1である。式(1)のYで表される官能基の比率がこれより高いと、生理活性物質の物理吸着を抑制するというZで表される官能基の作用効果が低くなるため好ましくなく、また式(1)のYで表される化合物の比率がこれより低いと、生理活性物質の固定化の効率が低下し、好ましくない。式(1)のYで表される官能基と式(1)のZで表される官能基の比率は、生理活性物質の固定化の効率と、生理活性物質の物理吸着を抑制する作用効果とのバランスを考慮して決定することが望ましい。

【0036】本発明の特に好ましい態様によれば、式(1)で表される化合物は、システインのアミノ基またはカルボキシル基のどちらか片方または両方に、アミノ酸が縮合した長さがジペプチド以上のシステインを含むペプチドまたはそれらの誘導体、または、それらのシステインを含むペプチドが、S-S結合で2量体のシステイン誘導体を形成したペプチドまたはそれらの誘導体であるさらに好ましくは、式(1)で表される化合物は、還元型、または酸化型グルタチオン、またはそれらの誘導体である

【0037】本発明では、生理活性物質を共有結合することができる官能基（即ち、上記の式(1)のYで表される官能基）とセンサーの性能を改善できる官能基（即ち、上記の式(1)のZで表される官能基）であり、好ましくは、生理活性物質またはその生理活性物質と相互作用するアナライトの物理吸着による変性を抑制できる化合物であるとを有する化合物を含む溶液で金属膜を処理することにより、生理活性物質を安定的に共有結合を介して金属表面に固定化できる。

【0038】本発明では、上記式(1)の化合物を含む

混合物を用いて金属表面又は金属膜を処理することにより、バイオセンサー用表面を作製する。具体的には、式(1)で表される化合物を、官能基YとZが上記した適当な範囲のモル比で適当な溶媒（例えば、水、エタノールなど）中に混合した溶液中に金属表面又は金属膜を浸し、一定時間表面処理を行うことにより、バイオセンサー用表面を作製することができる。

【0039】式(1)で表される化合物を含む混合物を用いて金属表面又は金属膜を処理する方法としては、上記のように該化合物を含む混合溶液中に金属膜等を一定時間浸漬する方法（浸漬法）以外にも、スピンコータを用いる方法（スピンコーティング法）、グラビア印刷機を用いる方法（グラビア法）などを例示することができる。

【0040】上記のようにして得られたバイオセンサー用表面はその表面に式(1)で表される化合物を有する。本発明によれば、バイオセンサー用表面に固定化された式(1)で表される化合物に直接あるいは架橋性化合物（例えば、水溶性多価性試薬等）またはヒドロゲルを介して生理活性物質を共有結合により結合させることによって、金属表面又は金属膜に生理活性物質を固定化する方法が提供される。

【0041】架橋性化合物としては、例えば、グルタルアルデヒド、過ヨウ素酸、N-スクシニミジル-2-マレイミド酢酸、N-スクシニミジル-4-マレイミド酢酸、N-スクシニミジル-6-マレイミドヘキサ酸、N-スクシニミジル-4-マレイミドメチルシクロヘキサノ-1-カルボン酸、N-スルホスクシニミジル-4-マレイミドメチルシクロヘキサノ-1-カルボン酸、N-スクシニミジル-4-マレイミドメチル安息香酸、N-スクシニミジル-3-マレイミド安息香酸、N-スルホスクシニミジル-3-マレイミド安息香酸、N-スクシニミジル-4-マレイミドフェニル-4-酪酸、N-スルホスクシニミジル-4-マレイミドフェニル-4-酪酸、NN'-オキシジメチレン-ジマレイミド、NN'-0-フェニレン-ジマレイミド、N、N'-m-フェニレン-ジマレイミド、N、N'-p-フェニレン-ジマレイミド、N、N'-ヘキサメチレン-ジマレイミド、N-スクシニミジルマレイミドカルボン酸、N-スクシニミジル-S-アセチルメルカプト酢酸、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、S-アセチルメルカプトスクシニクアンヒドライド、メチル-3-(4'-ジチオピリジル)プロピオニデート、メチル-4-メルカプトプロピオニミデート、メチル-3-メルカプトプロピオニミデート、イミノチオレン、0-カルボキシメチル-ヒドロキシルアミン、アゾジフェニルビルマレイミド、ビス(スルホスクシニミジル)スペレイト、4,4'-ジイソチオシアノ-2,2'-ジスルホン酸スチルベン、4,4'-ジフルオロ-3,3'-ジニトロジフェニルスルホン、1,5-ジフルオロ

ー2,4-ジニトロベンゼン、p-フェニレンジイソチオシアネイト、ジメチルアジピミデイト、ジメチルピメルイミデイト、ジメチルスベルイミデイト、p-アジドフェナシルプロマイド、p-アジドフェニルグリオキサール、N-ヒドロキシサクシニイミジル-4-アジドベンゾエイト、4-フルオロ-3-ニトロフェニルアジド、メチル-4-アジドベンゾイミデイト、N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシイミド、N-スクシイミジル6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエイト、1,4ベンゾキノン、N-スクシイミジル-3-(2'-ピリジルジチオ)プロピオネート、N-(4-マレイミドブチリロキシ)スルホスクシイミドナトリウム塩、N-(6-マレイミドカプロイロキシ)スルホスクシイミドナトリウム塩、N-(8-マレイミドカプロイロキシ)スルホスクシイミドナトリウム塩、N-(11-マレイミドウンデカノイロキシ)スルホスクシイミドナトリウム塩、N-[2-(1-ピペラジニル)エチル]マレイミド二塩酸、ビスジアゾベンジジン、ヘキサメチレンジイソシアネート、トルエンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N,N'-エチレンビスマレイニイミド、N,N'-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、2,4-ジニトロベンゼンスルフォネートナトリウム塩、ジアゾ化合物あるいは縮合試薬が $RN=C=N R$ (又は R')で表されるカルボジイミド誘導体、N-ヒドロキシスクシイミド、トリ-n-ブチルアミン、ブチルクロロフォルメーテ、イソブチルイソシアニドなどが挙げられる。

【0042】ヒドロゲルとしては、アガロース、デキストラン、キチン、キトサン、カラゲナン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、アルギン酸、澱粉及びセルロースからなる群より選択される多糖類もしくはこれらのいずれかの誘導体、並びにポリアクリル酸、ポリメタクリル酸などの合成ポリカルボン酸、ポリHEMAなどのポリヒドロキシルアルキルカルボン酸エステル、ポリアクリルアミドなどの合成ポリカルボン酸アミド、ポリビニルアルコール、エチレングリコール単位を有するオリゴマー及びポリマー、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ゼラチン、コラーゲンなどのポリペプチド、デンドリマーから選ばれた少なくとも一の化合物及び/又は該化合物の誘導体からなる親水性ポリマーなどが挙げられる。ヒドロゲルは所望の生理活性物質を固定化するために、水酸基、カルボキシル、アミノ、アルデヒド、カルボニル、エポキシ又はビニル基などの反応性基を含むように誘導体化されていることが好ましい。

【0043】本発明のバイオセンサー用表面上に固定される生理活性物質としては、測定対象物と相互作用するものであれば特に限定されず、例えば免疫蛋白質、酵素、微生物、核酸、低分子有機化合物、非免疫蛋白質、免疫グロブリン結合性蛋白質、糖結合性蛋白質、糖を認

識する糖鎖、脂肪酸もしくは脂肪酸エステル、あるいはリガンド結合能を有するポリペプチドもしくはオリゴペプチドなどが挙げられる。

【0044】免疫蛋白質としては、測定対象物を抗原とする抗体やハプテンなどを例示することができる。抗体としては、種々の免疫グロブリン、即ちIgG、IgM、IgA、IgE、IgDを使用することができる。具体的には、測定対象物がヒト血清アルブミンであれば、抗体として抗ヒト血清アルブミン抗体を使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を抗原とする場合には、例えば抗アトラジン抗体、抗カナマイシン抗体、抗メタンフェタミン抗体、あるいは病原性大腸菌の中でO抗原26、86、55、111、157などに対する抗体等を使用することができる。

【0045】酵素としては、測定対象物又は測定対象物から代謝される物質に対して活性を示すものであれば、特に限定されることなく、種々の酵素、例えば酸化還元酵素、加水分解酵素、異性化酵素、脱離酵素、合成酵素等を使用することができる。具体的には、測定対象物がグルコースであれば、グルコースオキシダーゼを、測定対象物がコレステロールであれば、コレステロールオキシダーゼを使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を測定対象物とする場合には、それらから代謝される物質と特異的反応を示す、例えばアセチルコリンエステラーゼ、カテコールアミンエステラーゼ、ノルアドレナリンエステラーゼ、ドーパミンエステラーゼ等の酵素を使用することができる。

【0046】微生物としては、特に限定されることなく、大腸菌をはじめとする種々の微生物を使用することができる。核酸としては、測定の対象とする核酸と相補的にハイブリダイズするものを使用することができる。核酸は、DNA(cDNAを含む)、RNAのいずれも使用できる。DNAの種類は特に限定されず、天然由来のDNA、遺伝子組換え技術により調製した組換えDNA、又は化学合成DNAの何れでもよい。低分子有機化合物としては通常有機化学合成の方法で合成することができる任意の化合物が挙げられ、好ましくは、本発明で使用する一般式Iのリンカー化合物と直接又は架橋性化合物を介して結合することができるような官能基を有する化合物である。

【0047】非免疫蛋白質としては、特に限定されることなく、例えばアビジン(ストレプトアビジン)、ビオチン又はレセプターなどを使用できる。免疫グロブリン結合性蛋白質としては、例えばプロテインAあるいはプロテインG、リウマチ因子(RF)等を使用することができる。糖結合性蛋白質としては、レクチン等が挙げられる。脂肪酸あるいは脂肪酸エステルとしては、ステア

リン酸、アラキジン酸、ペヘン酸、ステアリン酸エチル、アラキジン酸エチル、ペヘン酸エチル等が挙げられる。

【0048】生理活性物質が抗体や酵素などの蛋白質又は核酸である場合、その固定化は、生理活性物質のアミノ基、チオール基等を利用し、金属表面の官能基に共有結合させることで行うことができる。

【0049】上記のようにして生理活性物質を固定化されたバイオセンサー用表面は、バイオセンサー用測定チップとして、当該生理活性物質と相互作用する物質の検出及び／又は測定のために使用することができる。

【0050】即ち、本発明によれば、生理活性物質が固定化された本発明のバイオセンサー用測定チップを用いて、これに被験物質を接触させることにより、該バイオセンサー用表面に固定化されている生理活性物質と相互作用する物質を検出及び／又は測定する方法が提供される。被験物質としては例えば、上記した生理活性物質と相互作用する物質を含む試料などを使用することができる。

【0051】本発明では、バイオセンサー用表面に固定化されている生理活性物質と被験物質との相互作用を非電気化学的方法により検出及び／又は測定することが好ましい。非電気化学的方法としては、表面プラズモン共鳴（SPR）測定技術、水晶共振子マイクロバランス（QCM）測定技術、金のコロイド粒子から超微粒子までの機能化表面を使用した測定技術などが挙げられる。

【0052】本発明の好ましい態様によれば、本発明のバイオセンサー用測定チップは、例えば、透明基板上に配置される金属膜を備えていることを特徴とする表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ等として用いることができる。表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップとは、表面プラズモン共鳴バイオセンサーに使用されるチップであって、該センサーより照射された光を透過及び反射する部分、並びに生理活性物質を固定する部分とを含む部材を言い、該センサーの本体に固着されるものであってもよく、また脱着可能なものであってもよい。

【0053】表面プラズモン共鳴の現象は、ガラス等の光学的に透明な物質と金属薄膜層との境界から反射された単色光の強度が、金属の出射側にある試料の屈折率に依存することによるものであり、従って、反射された単色光の強度を測定することにより、試料を分析することができる。

【0054】

【実施例】以下の実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1：バイオセンサーチップ用表面の作製：

(1) チオール以外に2官能基を有す水溶性SAM試薬ーグルタチオンを用いたバイオセンサー用表面の作製：

50nmの金蒸着膜がある1cm(1cmのカバーガラスをModel-208UVーオゾンクリーニングシステム(TECHNOVISION INC.)で30分処理した後、1mMグルタチオン(還元型)の水溶液に浸して、25℃で18時間インキュベートした。その後、チップ表面を40℃の水で10回を洗浄した。

【0055】(2) 比較例1として、チオール以外に官能基をひとつしか有しない化合物(7ーカルボキシー1ーヘプタンチオール)によるバイオセンサー用表面の作製：金蒸着膜が50nmの1cm(1cmのカバーガラスをオゾンクリーナーで30分処理した後、1mMの7ーカルボキシー1ーヘプタンチオール(同仁化学)のエタノール溶液に浸して、25℃で18時間表面処理を行った。その後、40℃でエタノール5回、エタノール/水混合溶媒で1回、水で5回チップを洗浄した。

(3) 比較例2として、1mMのL-システイン(和光純薬)の水溶液に浸し、グルタチオンでの処理と同じ方法で、金蒸着膜の表面処理および洗浄を行った。

【0056】実施例2：バイオセンサーチップ用表面の性能評価：実施例1で作製した各々のチップを、市販の表面プラズモン共鳴バイオセンサー(ピアコア社製、BI-Acore3000)のカートリッジブロック上に設置し、メーカー推奨の方法で実験を行なった。

(1) 固定化用チップへの蛋白質の非特異結合の測定
固定化用チップへの蛋白質の非特異結合の測定は以下の通り行った(固定化用チップを、活性化剤を使用せず蛋白質と反応させた。蛋白質が吸着されないほうが望ましい)。作製したチップをそのまま、40mg/mlのプロテインAの10mM酢酸緩衝液(pH4.5)を10分間流し込み、プロテインAの物理吸着量を測定した。また、15μg/mlのウサギIgGのpH7のHBS緩衝液を10分間流し込み、ウサギIgGの非特異吸着量を測定した。流速は10μL/分を用いた。それぞれ、10分後の共鳴シグナル(RU)を、物理吸着の指標とした。

【0057】(2) 蛋白質相互作用の測定

蛋白質相互作用の測定は以下の通り行った。生理活性物質固定化用チップを、1ーエチルー2, 3ージメチルアミノプロピルカルボジイミド(400mM)とNーヒドロキシスクシンイミド(100mM)との混合液70μLを流速10μL/minで測定セルに流し込み、40mg/mlのプロテインAの10mM酢酸緩衝液溶液(pH4.5)を30分間流し込むことで、チップにプロテインAを固定した。その後、固定化したプロテインAを70μLの1Mエタノールアミン(pH8)で未反応成分を分解後、10μLの10mMグリシン・塩酸緩衝液(pH2)を測定セルに流し込み、洗浄した。プロテインAを固定化した測定セルに、15μg/mlに希釈したウサギIgGを流速10μL/分で10分間流しながら、光強度を測定し、共鳴シグナルを求めた。プロテインA固定化による共鳴シグナル変化量(RU)、お

よび、結合したIgGの共鳴シグナル変化量(RU)を望ましい指標とした。

【0058】(3)結果

表1にグルタチオン、7-カルボキシー-1-ヘプタンチオールおよびL-システインによる表面修飾したチップ表面

のリガンド(プロテインA)の物理吸着量、リガンド

表1. グルタチオン処理チップと7-カルボキシー-1-ヘプタンチオールまたはL-システイン処理チップの比較

表面処理に用いた化合物	プロテインAの物理吸着量(RU)	アナライト(ウサギIgG)の非特異結合量(RU)	プロテインA固定化量(RU)	ウサギIgG結合量(RU)
グルタチオン(本発明)	-90.0	-80.0	851.0	5531
7-カルボキシー-1-ヘプタンチオール(比較例1)	441.4	17.6	911.6	2350
L-システイン(比較例2)	14.5	291.2	628.2	2771

【0060】表1の結果から、グルタチオンで表面処理を行うことにより、比較例である7-カルボキシー-1-ヘプタンチオールおよびシステインと比較し、タンパク質の物理吸着及び非特異的な結合が減少したことがわかる。また、グルタチオンで表面処理を行なうことにより、同様に、チップに固定化されたプロテインAの固定化量は同程度だが、ウサギIgGの固定化量が相対的に向上したことがわかる。この結果は、固定化後のプロテインAの結合活性は、相対的に保持されたことを示す。 ※

※(プロテインA)の共有結合による固定化量、アナライト(ウサギIgG)の特異的結合量、アナライト(ウサギIgG)の非特異的結合量を示す。

【0059】

【表1】

※【0061】

【発明の効果】本発明により、グルタチオンによる金属表面は、7-カルボキシー-1-ヘプタンチオールやシステインでの表面処理と比較し、生理活性物質を、ほとんどの分子が、活性を保ったまま、脱落することなく固定化するための手段であって、かつ、不必要な物理吸着や非特異結合を軽減でき、処理過程が簡便で信頼性の高い方法を提供することが可能になった。

フロントページの続き

(72)発明者 小島 政芳

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フイルム株式会社内

(72)発明者 須藤 幸夫

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フイルム株式会社内

Fターム(参考) 2G045 FA11 HA02

2G059 AA05 CC16 CC20 DD13 EE01
EE02

* NOTICES *

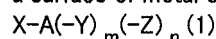
JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]The surface for biosensors for fixing a physiological active substance by a covalent bond which comprises a surface of metal or a metal membrane processed with a compound denoted by a following formula (1).



X is shown in [type (1) and a functional group which can form a surface of metal and a covalent bond A, A connecting group more than trivalent [which is chosen from amino acid residue which is not replaced / substitution or /, an aliphatic group, an aromatic group, heterocycle groups or such combination] is shown, and a functional group which Y can combine with a physiological active substance, and Z show a functional group which can improve performance of a sensor. m and n show one or more integers. However, a compound denoted by a formula (1) is except cystein.]

[Claim 2]The surface for biosensors according to claim 1 used for non-electrochemical detection.

[Claim 3]The surface for biosensors according to claim 1 or 2 used for surface-plasmon-resonance analysis.

[Claim 4]X in a formula (1) A thiol (-SH), isonitrile, nitro (-NO₂), Selenol (-SeH), trivalent phosphorus compounds, an isothiocyanate, xanthate, A thio carbamate, phosphine, thio acid (-COSH), dithioic acid (-CSSH), Asymmetry or a symmetric disulfide [-SSA¹(-Y¹)_{m1}(-Z¹)_{n1}], A sulfide [-SA¹(-Y¹)_{m1}(-Z¹)_{n1}], Diselenide [-SeSeA¹(-Y¹)_{m1}(-Z¹)_{n1}], Or selenide [-SeA¹(-Y¹)_{m1}(-Z¹)_{n1}] is shown, and here A¹, A connecting group more than trivalent [which is chosen from amino acid residue which is not replaced / substitution or /, an aliphatic group, an aromatic group heterocycle groups, or such combination] is shown, The surface for biosensors according to any one of claims 1 to 3 which shows a functional group which Y¹ can combine with a physiological active substance, and a functional group in which Z¹ can improve performance of a sensor and where m1 and n1 show one or more integers.

[Claim 5]The surface for biosensors according to any one of claims 1 to 4 whose Y is -OH, -COOH, -NH₂, -CHO, -NHNH₂, -NCS, an epoxy group, or a vinyl group in a formula (1).

[Claim 6]The surface for biosensors according to any one of claims 1 to 5 which is a functional group which can control denaturation or physical adsorption of analyte in which Z interacts with a physiological active substance combined with Y, or its physiological active substance in a formula (1).

[Claim 7]The surface for biosensors according to any one of claims 1 to 6 whose Z is -OH, -COOH, -NH₂, and -SO₃H, alkyl ester or an aryl ester group, sugar, nucleic acid, protein, or water-soluble polymer in a formula (1).

[Claim 8]The surface for biosensors according to any one of claims 1 to 7 whose compounds denoted by a formula (1) are peptide in which length which amino acid condensed contains cystein more than dipeptide in both an amino group of cystein, or both [which, one of the two or], or those derivatives.

[Claim 9]The surface for biosensors according to any one of claims 1 to 8 which are peptide in which a compound denoted by a formula (1) formed a cystine derivative of a dimer by an SS linkage in peptide containing cystein of Claim 7, or those derivatives.

[Claim 10]The surface for biosensors according to any one of claims 1 to 9 whose compounds denoted by a formula (1) are a reduction type, oxidized glutathiones, or those derivatives.

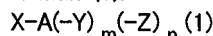
[Claim 11]A measuring chip for biosensors produced by making the surface for biosensors according to any one of claims 1 to 10 carry out the covalent bond of the physiological active substance.

[Claim 12]How to detect and/or measure a substance which interacts with a physiological active substance fixed by this surface for biosensors including a process at which the surface for biosensors according to any one of claims 1 to 10, or a measuring chip for biosensors according to claim 11 and an examined substance are contacted.

[Claim 13]A method according to claim 12 of detecting and/or measuring an interaction of a physiological active substance and an examined substance which are fixed by the surface for biosensors with a non-electrochemical process.

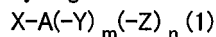
[Claim 14]A method according to claim 12 or 13 of detecting and/or measuring an interaction of a physiological active substance and an examined substance which are fixed by the surface for biosensors by surface-plasmon-resonance analysis.

[Claim 15]A process processed with mixed liquor containing a compound denoted by at least one kind of following formula (1) in a surface of metal or a metal membrane is included, A manufacturing method of the surface for biosensors for fixing a physiological active substance by a covalent bond which comprises a surface of metal or a metal membrane processed with a mixture containing a compound denoted by at least one kind of following formula (1).



X is shown in [type (1) and a functional group which can form a surface of metal and a covalent bond A, A connecting group more than trivalent [which is chosen from amino acid residue which is not replaced / substitution or /, an aliphatic group, an aromatic group, heterocycle groups or such combination] is shown, and a functional group which Y can combine with a physiological active substance, and Z show a functional group which can improve performance of a sensor. m and n show one or more integers. However, a compound denoted by a formula (1) is except cystein.]

[Claim 16]A process which combines a physiological active substance with a compound denoted by the process; processed with a mixture containing a compound denoted by at least one kind of following formula (1) in a surface of metal or a metal membrane and this type (1) by a covalent bond via a direct or cross-linking compound or hydrogel is included, How to fix a physiological active substance in a surface of metal or a metal membrane.



X is shown in [type (1) and a functional group which can form a surface of metal and a covalent bond A, A connecting group more than trivalent [which is chosen from amino acid residue which is not replaced / substitution or /, an aliphatic group, an aromatic group, heterocycle groups or such combination] is shown, and a functional group which Y can combine with a physiological active substance, and Z show a functional group which can improve performance of a sensor. m and n show one or more integers. However, a compound denoted by a formula (1) is except cystein.]

[Claim 17]X in a formula (1) A thiol (-SH), isonitrile, nitro (-NO₂), Selenol (-SeH), trivalent phosphorus compounds, an isothiocyanate, xanthate, A thio carbamate, phosphine, thio acid (-COSH), dithioic acid (-CSSH), Asymmetry or a symmetric disulfide [-SSA¹(-Y¹)_{m1}(-Z¹)_{n1}], A sulfide [-SA¹(-Y¹)_{m1}(-Z¹)_{n1}], Diselenide [-SeSeA¹(-Y¹)_{m1}(-Z¹)_{n1}], Or selenide [-SeA¹(-Y¹)_{m1}(-Z¹)_{n1}] is shown, and here A¹, A connecting group more than trivalent [which is chosen from amino acid residue which is not replaced / substitution or /, an aliphatic group, an aromatic group heterocycle groups, or such combination] is shown, A way according to claim 15 or 16 a functional group which Y¹ can combine with a physiological active substance, and a functional group in which Z¹ can improve performance of a sensor are shown, and m1 and n1 show one or more integers.

[Claim 18]A way according to any one of claims 15 to 17 Y is -OH, -COOH, -NH₂, -CHO, -NHNH₂, -NCS, an epoxy group, or a vinyl group in a formula (1).

[Claim 19]A way according to any one of claims 15 to 18 Z is -OH, -COOH, -NH₂, and -SO₃H, alkyl ester or an aryl ester group, sugar, nucleic acid, protein, or water-soluble polymer in a formula (1).

[Claim 20]A way according to any one of claims 15 to 19 compounds denoted by a formula (1) are peptide in which length which amino acid condensed contains cystein more than dipeptide in both an amino group of cystein, or both [which, one of the two or], or those derivatives.

[Claim 21]A method according to claim 20 of being peptide in which a cystine derivative in which a compound denoted by a formula (1) formed a dimer by an SS linkage in peptide containing cystein of Claim 20 was formed, or those derivatives.

[Claim 22]A way according to any one of claims 15 to 21 compounds denoted by a formula (1) are a reduction type, oxidized glutathiones, or those derivatives.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]The surface for biosensors consisting of the surface of metal or metal membrane processed with the linker compound which can combine this invention with a physiological active substance, It is related with the measuring chips for biosensors which fixed the physiological active substance on this surface for biosensors, those manufacturing methods, and the measuring method using them.

[0002]

[Description of the Prior Art]Although many measurement which used intermolecular interactions, such as immunoreaction, by the clinical laboratory test etc. is performed now, in the conventional method, some technology in which coupling amount change of a measuring substance is detectable to high sensitivity is used, without needing a marker, since complicated operation and marker are needed. For example, they are surface-plasmon-resonance (SPR) measuring technique, crystal oscillator microbalance (QCM) measuring technique, and the measuring technique that uses the functionalization surface from a golden colloidal particle to an ultrafine particle. By measuring and asking for change of reflected light quantity [in / for the refractive index change near / which touches the metal membrane of a chip / the organic functional membrane / the peak shift or fixed wavelength of reflected-light-waves length], SPR measuring technique is the method of detecting the adsorption and desorption which take place near the surface. QCM measuring technique is the technology in which adsorption-and-desorption mass is detectable from the frequency change of the radiator by the adsorption and desorption of the substance on the gold electrode (device) of a crystal oscillator on ng level. Detection of a living body related substance can be performed from sedimentation of golden particles, and arrangement by making the golden ultrafine particle (nm level) surface functionalize, fixing a physiological active substance on it, and making the unique recognition reaction between physiological active substances perform.

[0003]In the case of which, in all the above technology, the surface which fixes a physiological active substance is important. Hereafter, this technical field explains by making into an example surface plasmon resonance (SPR) currently used most.

[0004]The measuring chip generally used consists of a transparent base (for example, glass), a vapor-deposited metal membrane, and a thin film which has a functional group which can fix a physiological active substance on it, and fixes a physiological active substance in a surface of metal via the functional group. The interaction between biomolecules is analyzed by measuring the specific ligation reaction between this physiological active substance and analyte.

[0005]As a thin film which has a functional group which can fix a physiological active substance, The measuring chip which fixed the physiological active substance using the compound which has a functional group combined with metal, a linker whose atomic number of chain length is ten or more, and a functional group combinable with a physiological active substance is reported (see the patent No. 2815120).

[0006]However, the un-unique combination by the physical adsorption on ligand (or analyte) and the surface of an organic layer has bad influence on the sensitivity of a chip. That is, when a physiological active substance is fixed by the metal membrane, it is not only fixed only by the covalent bond of the purpose, but a physiological active substance is selectively fixed by physical adsorption. If protein is fixed by physical adsorption to a gold surface, protein will denaturalize easily. There is a problem of dropping out during measurement, as compared with immobilization by a covalent bond. In order that these problems might bring about the sensitivity lowering of measurement, and degradation of reproducibility as a result, a measure for abolishing unnecessary physical adsorption was desired.

[0007]Some methods are adopted in order to solve this problem. For example, the method of controlling physical adsorption has also been used for a surface of metal by fixing the hydro-gel of hydrophilic nature via a linker (see the patent No. 2815120, US,5436161,B, and JP,H8-193948,A). However, since immobilization of hydro-gel was not easy for this method, various users doubled with their purpose and were not suitable for performing a surface treatment. When hydro-gel was used and the analyte (analyte) of the amounts of polymers, such as a cell, was

measured, there was a problem that analyte could not invade into the crevice between matrices.

[0008]In immunochemistry analysis using a plastic plate as a method of on the other hand reducing the un-unique combination by physical adsorption of a physiological active substance, what is called blocking by bovine serum albumin etc. has been used. When DNA which thiol-ized the end is fixed in a metal membrane in the analysis method using a surface of metal and it produces the DNA sensor using SPR, by adding 6-hydroxy-1-heptanethiol, Nonspecific adsorption does not happen but it is reported that purpose DNA is detectable by high sensitivity (see US,5942397,B and J.Am.Chem.Soc., 1997, 119, and 8916-8920). Simultaneous mixing of biotin and 11-hydroxy-1-undecanethiol which were thiol-ized is carried out, and controlling un-unique combination and detecting a reaction with SUTOREPUTOBIJIN is reported (J. refer to Am.Chem.Soc., 1999, 121, and 6469-6478).

[0009]However, these methods also have the following problem. Namely, these aim nonspecific adsorption of an analysis target subject (analyte) at control.

Solution over a problem about unnecessary denaturation or omission of a physiological active substance by some physiological active substances fixed carrying out physical adsorption is not given.

Composition of the derivative of the physiological active substance which can carry out immobilization directly is not easy for a surface of metal. Since, as for SAM using these two ingredients, there is a problem in homogeneity or reproducibility in the production, it is single components and a surface of metal with little denaturation and physical adsorption of a physiological active substance is desired.

[0010]The example which uses the compound of a short chain is shown as SAM of one ingredient (Biosensor & Bioelectronics, 1998 and 13, 1213-1225). Cystein was contained in the example and immobilization more stable than fixing by physical adsorption directly in a surface of metal without SAM was attained for it by carrying out the covalent bond of the immunoglobulin using the carboxyl group. However, in this report, reference is not made about the effect that the functional group of the hydrophilic nature which exists in cystein controls protein denaturation. These problems exist not only like surface-plasmon-resonance (SPR) technology but like QCM technology and gold-ultrafine-particles technology.

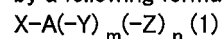
[0011]

[Problem to be solved by the invention]The issue which this invention tends to solve is canceling the problem of the above-mentioned conventional technology. Namely, this invention makes a surface of metal reduce denaturation according [almost all molecules] a physiological active substance to an interaction with physical adsorption or a canal flat surface, and has maintained activity at it as much as possible. It is a means for fixing, without dropping out, and the processing process made it the issue which should be solved to provide a simple and reliable surface of metal and fixing method, its manufacturing method, and the analytical method using them.

[0012]

[Means for solving problem]In order that this invention persons may solve an aforementioned problem, as a result of inquiring wholeheartedly, when a physiological active substance is fixed in a surface of metal, a physiological active substance with the functional group for joining together via a covalent bond, By processing a surface of metal to the same intramolecular with the compound which has a functional group which controls physical adsorption and denaturation of a physiological active substance, and making a physiological active substance react to it after that, it finds out that a physiological active substance is stably fixable in a surface of metal via a covalent bond, and came to complete this invention. It was found out that the bio sensor chip produced using this surface also reduces the conventional problem. When the surface which processed the surface of metal with the peptide which contains cystein or cystine especially, or its derivative was used, rather than the surface processed by a cystein independent, reappearance was simply good and it was found out that a physiological active substance is stably fixable in a surface of metal via a covalent bond.

[0013]That is, according to this invention, the surface for biosensors for fixing a physiological active substance by a covalent bond which comprises the surface of metal or metal membrane processed with the compound denoted by a following formula (1) at least is provided.



X is shown in [type (1) and the functional group which can form a surface of metal and a covalent bond A, The connecting group more than trivalent [which is chosen from the amino acid residue which is not replaced / substitution or /, an aliphatic group, an aromatic group, heterocycle groups, or such combination] is shown, and the functional group which Y can combine with a physiological active substance, and Z show the functional group which can improve the performance of a sensor. m and n show one or more integers. However, the compound denoted by a formula (1) is except cystein.]

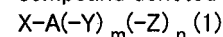
[0014]The surface for biosensors of this invention is preferably used for non-electrochemical detection, and is especially used for surface-plasmon-resonance analysis preferably. In a formula (1), X preferably A thiol (-SH), isonitrile, Nitro (-NO₂), selenol (-SeH), trivalent phosphorus compounds, An isothiocyanate, xanthate, a thio carbamate, phosphine, Thio acid (-COSH), dithioic acid (-CSSH), asymmetry, or a symmetric disulfide [-SSA¹(-Y¹)

$m_1(-Z^1)_{n_1}$, A sulfide $[-SA^1(-Y^1)_{m_1}(-Z^1)_{n_1}]$, Diselenide $[-SeSeA^1(-Y^1)_{m_1}(-Z^1)_{n_1}]$, Or selenide $[-SeA^1(-Y^1)_{m_1}(-Z^1)_{n_1}]$ is shown, and here A^1 , The connecting group more than trivalent [which is chosen from the amino acid residue which is not replaced / substitution or /, an aliphatic group, an aromatic group, heterocycle groups, or such combination] is shown, The functional group which Y^1 can combine with a physiological active substance, and the functional group in which Z^1 can improve the performance of a sensor are shown, and m_1 and n_1 show one or more integers.

[0015] Preferably, in a formula (1), Y is $-OH$, $-COOH$, $-NH_2$, $-CHO$, $-NHNH_2$, $-NCS$, an epoxy group, or a vinyl group. Preferably, in a formula (1), Z is a functional group which can control the denaturation or physical adsorption of analyte which interacts with the physiological active substance combined with Y , or its physiological active substance. Preferably, in a formula (1), Z is $-OH$, $-COOH$, $-NH_2$, and $-SO_3H$, alkyl ester or aryl ester, sugar, nucleic acid, protein, or water-soluble polymer.

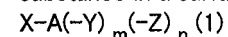
[0016] Preferably the compound denoted by a formula (1) to both the amino group of cystein, or both [which, one of the two or]. The peptide in which the length which amino acid condensed contains the cystein more than dipeptide, or those derivatives, Or the compounds whose peptide containing those cysteins is the peptide which formed the cystine derivative of the dimer by the SS linkage, or those derivatives and which are denoted by a formula (1) are a reduction type, oxidized glutathiones, or those derivatives still more preferably. [0017] According to another side of this invention, the measuring chip for biosensors produced by making the surface for biosensors of above-mentioned this invention carry out the covalent bond of the physiological active substance is provided. According to another side of this invention, the method of detecting and/or measuring the substance which interacts with the physiological active substance fixed by this surface for biosensors including the process at which the surface for biosensors or the measuring chip for biosensors, and examined substance of above-mentioned this invention are contacted is provided. The interaction of the physiological active substance and examined substance which are fixed by the surface for biosensors is preferably detected and/or measured by a non-electrochemical process, and preferably especially, The interaction of the physiological active substance and examined substance which are fixed by the surface for biosensors is detected and/or measured by surface-plasmon-resonance analysis.

[0018] According to another side of this invention, the process processed with the mixture containing the compound denoted by at least one kind of following formula (1) in a surface of metal or a metal membrane is included, The manufacturing method of the surface for biosensors for fixing a physiological active substance by a covalent bond which comprises the surface of metal or metal membrane processed with the mixture containing the compound denoted by at least one kind of following formula (1) is provided.



X is shown in [type (1) and the functional group which can form a surface of metal and a covalent bond A , The connecting group more than trivalent [which is chosen from the amino acid residue which is not replaced / substitution or /, an aliphatic group, an aromatic group, heterocycle groups, or such combination] is shown, and the functional group which Y can combine with a physiological active substance, and Z show the functional group which can improve the performance of a sensor. m and n show one or more integers. However, the compound denoted by a formula (1) is except cystein.]

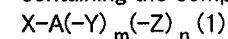
[0019] According to another side of this invention, a surface of metal or a metal membrane, The process which combines a physiological active substance with the compound denoted by the process; processed with the mixture containing the compound denoted by at least one kind of following formula (1) and this type (1) by a covalent bond via a direct or cross-linking compound or hydrogel is included, The method of fixing a physiological active substance in a surface of metal or a metal membrane is provided.



X is shown in [type (1) and the functional group which can form a surface of metal and a covalent bond A , The connecting group more than trivalent [which is chosen from the amino acid residue which is not replaced / substitution or /, an aliphatic group, an aromatic group, heterocycle groups, or such combination] is shown, and the functional group which Y can combine with a physiological active substance, and Z show the functional group which can improve the performance of a sensor. m and n show one or more integers. However, the compound denoted by a formula (1) is except cystein.]

[0020]

[Mode for carrying out the invention] Hereafter, an embodiment of the invention is described. The surface for biosensors of this invention comprises the surface of metal or metal membrane processed with the mixture containing the compound denoted by at least one kind of following formula (1).



X is shown in [type (1) and the functional group which can form a surface of metal and a covalent bond A , The

connecting group more than trivalent [which is chosen from the amino acid residue which is not replaced / substitution or /, an aliphatic group, an aromatic group, heterocycle groups, or such combination] is shown, and the functional group which Y can combine with a physiological active substance, and Z show the functional group which can improve the performance of a sensor. m and n show one or more integers. However, the compound denoted by a formula (1) is except cystein.]

[0021]The surface for biosensors of this invention is manufactured by processing with the mixture containing the compound denoted by at least one kind of following formula (1) which defines a surface of metal or a metal membrane as this Description. The metal membrane is preferably arranged on the substrate. Here, it is ["it is arranged on a substrate", and] a meaning also including the case where it is arranged via other layers, without a metal membrane besides in the case of being arranged so that a metal membrane may carry out direct contact on a substrate carrying out direct contact to a substrate.

[0022]When a metal membrane is arranged on a substrate, a measuring chip for biosensors of this invention is provided with the following.

Substrate.

A metal membrane formed on a substrate.

A linker layer formed on a metal membrane (a compound shown by the general formula I is comprised).

[0023]As a substrate which can be used by this invention, for example, when the object for surface-plasmon-resonance biosensors is considered, As long as it is used for the fixing method, what kind of thing may be used, and what generally consists of a transparent material to laser beams, such as glass, polyethylene terephthalate, and polycarbonate, can be used. Such a substrate has a desirable material which did not show anisotropy to polarization and was excellent in processability preferably. Although the thickness in particular of a substrate is not limited, it is usually about 0.1-20 mm.

[0024]As a metal membrane in the measuring chip for biosensors of this invention, when the object for surface-plasmon-resonance biosensors is considered, especially if it seems that surface plasmon resonance may arise, it will not be limited, for example. gold, silver, copper, aluminum, platinum, etc. are mentioned as a kind of metal which can be used for this metal membrane — them — it can be used, being able to be independent or combining. In consideration of the adhesion to the above-mentioned substrate, the intervening layer which consists of chromium etc. may be provided between the layers consisting of a substrate, gold, silver, etc.

[0025]Although the thickness of a metal membrane is arbitrary, when the object for surface-plasmon-resonance biosensors is considered for example, it is preferred that it is 100-2000 Å, and it is especially preferred that it is 200-600 Å. If it exceeds 3000 Å, the surface plasmon phenomenon of a medium cannot be detected enough. As for the thickness of the intervening layer, when providing the intervening layer which consists of chromium etc., it is preferred that it is 5-50 Å. What is necessary is just to perform formation of a metal membrane with a conventional method, and it can carry out by a sputtering method, vacuum deposition, the ion plating method, electroplating, a nonelectrolytic plating method, etc.

[0026]Next, the compound denoted by the formula (1) used by this invention is explained. In a formula (1), if X is a functional group which can form a surface of metal and a covalent bond, the kind in particular will not be limited. X preferably A thiol (-SH), isonitrile, nitro (-NO₂), Selenol (-SeH), trivalent phosphorus compounds, an isothiocyanate, xanthate, A thio carbamate, phosphine, thio acid (-COSH), dithioic acid (-CSSH), Asymmetry or a symmetric disulfide [$[-SSA^1(-Y^1)_{m1}(-Z^1)_{n1}]$], A sulfide [$[-SA^1(-Y^1)_{m1}(-Z^1)_{n1}]$], Diselenide [$[-SeSeA^1(-Y^1)_{m1}(-Z^1)_{n1}]$], Or selenide [$[-SeA^1(-Y^1)_{m1}(-Z^1)_{n1}]$] is shown, and here A¹, The connecting group more than trivalent [which is chosen from the amino acid residue which is not replaced / substitution or /, an aliphatic group, an aromatic group, heterocycle groups, or such combination] is shown, The functional group which Y¹ can combine with a physiological active substance, and the functional group in which Z¹ can improve the performance of a sensor are shown, and m1 and n1 show one or more integers.

[0027]Especially preferably, X is a thiol (-SH), asymmetry, or a symmetric disulfide [$[-SSA^1(-Y^1)_{m1}(-Z^1)_{n1}]$], and

X is a thiol (-SH) most preferably. [0028]In a formula (1), A and A¹ shows the connecting group more than trivalent [which is chosen from the amino acid which is not replaced / substitution or /, an aliphatic group, an aromatic group, heterocycle groups, or such combination]. The basis from which the same basis also differs may be sufficient as A and A¹. As for A and A¹, it is preferred that it is a hydrocarbon group. The connecting group more than trivalent [which A and A¹ shows] is preferred, chain length's atomic number is ten or less, and chain length's atomic number is eight or less more preferably.

[0029]As amino acid of amino acid residue, a glycine, an alanine, etc. besides the cystein coupled directly with metal may be mentioned, and the peptide polymerized and formed may be sufficient as them. As an aliphatic group, an alkylene group, an alkenylene group, or alkynylene group may be included, and any of a straight chain, branched

chain, cyclic chains, or such combination may be sufficient as the form of a chain. Especially as an aliphatic group, an alkylene group is preferred and is an alkylene group of a straight chain most preferably. Although the length in particular of an aliphatic group is not limited, for example it is the carbon numbers 1-20, is about one to ten carbon number more preferably, and is about two to ten carbon number especially preferably. As an aromatic group, an allylene group etc. are mentioned and a phenylene group, a naphthylene group, etc. are specifically mentioned. [0030] A monocycle or a condensed ring of the saturation of 5 or 7 members or an unsaturation etc. which contains as heterocycle one or more sorts of one or more hetero atoms chosen from a nitrogen atom, an oxygen atom, or a sulfur atom is mentioned. Specifically Pyridine, quinoline, an isoquinoline, pyrimidine, pyrazine, Pyridazine, phthalazine, triazine, a franc, a thiophene, pyrrole, oxazol, benzooxazol, a thiazole, benzothiazole, imidazole, benzimidazole, thiadiazole, triazole, etc. are mentioned. A heterocycle group means the divalent basis derived from heterocycle which was described above.

[0031] The connecting group more than trivalent [which is denoted by A and A¹] may comprise combination of an aliphatic group and an aromatic group which were described above, or a heterocycle group. If the valence of the connecting group denoted by A and A¹ is more than trivalent, although the maximum in particular is not limited, it is below tetravalence more preferably and below pentavalence is trivalent most preferably. When the valence of the connecting group denoted by A and A¹ is more than tetravalence, A can have a substituent denoted by the substituent and/or two or more -Z which are denoted by two or more -Y.

[0032] In a formula (1), Y can show a functional group combinable with a physiological active substance, and the kind of the functional group can be suitably chosen according to the kind of physiological active substance to fix. Generally, Y is -OH, -COOH, -NH₂, -CHO, -NHNH₂, -NCS, an epoxy group, or a vinyl group.

[0033] In a formula (1), the functional group etc. which can control the denaturation of the analyte which Z shows the functional group which can improve the performance of a sensor, for example, interacts with a physiological active substance or its physiological active substance, or physical adsorption to a surface of metal are mentioned. Such a functional group can be suitably chosen according to the kind of physiological active substance to fix as a different basis from a functional group combinable with the physiological active substance shown by Y. Generally, Y is -OH, -COOH, -NH₂, and -SO₃H, alkyl ester or aryl ester, sugar, nucleic acid, protein, or water-soluble polymer (for example, hydrophilic radicals, such as a polyoxyethylene).

[0034] In a formula (1), respectively m, n, m1, and n1 show one or more integers, they show 1 to 10 preferably independently, show 1 to 5 more preferably, show 1 to 2 still more preferably, and are 1 most preferably.

[0035] The number of the intramoleculars of the functional groups Y and Z of a compound denoted by a formula (1) can be suitably chosen according to the kind of physiological active substance, an experimental condition, etc. The functional group generally denoted by Y of a formula (1): The mole ratio in the intramolecular of a functional group denoted by Z of a formula (1) is within the limits of 1:10 to 10:1, is within the limits of 1:5 to 5:1 preferably, and is 1:1 especially preferably. Since the operation effect of a functional group denoted by Z of controlling physical adsorption of a physiological active substance when the ratio of the functional group denoted by Y of a formula (1) is higher than this becomes low, if it is not desirable and the ratio of the compound denoted by Y of a formula (1) is lower than this, The efficiency of immobilization of a physiological active substance falls and it is not desirable. As for the ratio of the functional group denoted by Y of a formula (1), and the functional group denoted by Z of a formula (1), it is desirable to determine in consideration of the balance of the efficiency of immobilization of a physiological active substance and the operation effect which controls physical adsorption of a physiological active substance.

[0036] According to the especially desirable mode of this invention, the compound denoted by a formula (1), The peptide in which the length which amino acid condensed contains the cystein more than dipeptide in both the amino group of cystein, or both [which, one of the two or], or those derivatives, Or the compounds whose peptide containing those cysteins is the peptide which formed the cystine derivative of the dimer by the SS linkage, or those derivatives and which are denoted by a formula (1) are a reduction type, oxidized glutathiones, or those derivatives still more preferably. [0037] The functional group which can carry out the covalent bond of the physiological active substance in this invention. (Namely, the functional group denoted by the above-mentioned Y of formula (1)), and the functional group which can improve the performance of a sensor (that is, it is a functional group denoted by Z of the above-mentioned formula (1), and preferably) the compound which can control denaturation by physical adsorption of the analyte which interacts with a physiological active substance or its physiological active substance -- it is -- by processing a metal membrane with the solution containing the compound which it has, a physiological active substance is stably fixable in a surface of metal via a covalent bond.

[0038] In this invention, the surface for biosensors is produced by processing a surface of metal or a metal membrane using the mixture containing the compound of the above-mentioned formula (1). The surface for biosensors is producible by dipping a surface of metal or a metal membrane into the solution which specifically mixed the compound denoted by a formula (1) in suitable solvents (for example, water, ethanol, etc.) by the mole ratio of the suitable range which the functional groups Y and Z described above, and performing a surface

treatment for a definite period of time.

[0039]As a method of processing a surface of metal or a metal membrane using the mixture containing the compound denoted by a formula (1), The method (the spin coating method) of using a spin coater besides the method (dip coating) of immersing a metal membrane etc. for a definite period of time into the mixed solution which contains this compound as mentioned above, the method (the photogravure method) of using a photogravure printing machine, etc. can be illustrated.

[0040]The surface for biosensors produced by performing it above has a compound denoted by the surface by a formula (1). According to this invention, to the compound denoted by the formula (1) fixed by the surface for biosensors A direct or cross-linking compound. The method of fixing a physiological active substance in a surface of metal or a metal membrane is provided by combining a physiological active substance by a covalent bond via (for example, a water-soluble multivalent nature reagent) etc. or hydrogels.

[0041]As a cross-linking compound, for example Glutaraldehyde, periodic acid, N-succinimidyl 2-maleimide acetic acid, N-succinimidyl 4-maleimide butanoic acid, N-succinimidyl 6-maleimide hexanoic acid, N-succinimidyl 4-maleimide methylcyclohexane 1-carboxylic acid, N-sulphosuccinimidyl 4-maleimide methylcyclohexane 1-carboxylic acid, N-succinimidyl 4-maleimide methylbenzoic acid, N-succinimidyl 3-maleimide benzoic acid, N-sulphosuccinimidyl 3-maleimide benzoic acid, N-succinimidyl 4-maleimide phenyl-4-butanoic acid, N-sulphosuccinimidyl 4-maleimide phenyl-4-butanoic acid, NN'-oxydi methylene-dimaleimido, NN'-O-phenylene-dimaleimido, N,N'-m-phenylene-dimaleimido, N,N'-p-phenylene-dimaleimido, N,N'-hexamethylene dimaleimido, N-succinimidyl maleimide carboxylic acid, N-succinimidyl S-acetylmercaptoacetic acid, N-succinimidyl 3-(2-pyridyl dithio) propionate, S-acetylmercapto SUKUSHINIKKUANHI dried **. A methyl-3-(4'-dithiopyridyl) pro PIONIMI date, methyl-4-mercaptobutyl imidate, A methyl-3-mercapto pro PIONIMI date, imino CHIOREN, O-carboxymethyl hydroxylamine, Azodiphenyl BIRUMAREIMIDO, bis(sulfo SAKUSHINIIMIJIIRU)SUPEREITO, A 4,4'-JIISO thiocyanate 2,2'-disulfon acid stilbene, 4,4'-difluoro-3,3'-dinitro diphenylsulfone, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene, p-Feni range isothiocyanate, dimethyl horse mackerel PIMIDEITO, dimethyl PIMERU imidate, Dimethyl SUBERU imidate, p-azide FENA acyl star's picture, p-azidophenyl griot KISARU, N-hydroxy SAKUSHINI Mizil 4-azide benzoate, 4-fluoro-3-nitrophenyl azide, Methyl-4-azidobenzo imidate, N-5-azide 2-nitrobenzoyloxy SUKUSHI imide, N-SUKUSHINIIMIJIIRU 6-(4'-azide 2'-nitrophenyl amino) hexanoate, 1, 4 benzoquinone, N-succinimidyl 3-(2'-pyridyl dithio) propionate, N-(4-maleimide BUCHIRIROKISHI) sulfosuccinimide sodium salt, N-(6-maleimide KAPURO yloxy) sulfosuccinimide sodium salt, N-(8-maleimide KAPURO yloxy) sulfosuccinimide sodium salt, N-(11-maleimide undecanone yloxy) sulfosuccinimide sodium salt, N-[2-(1-piperazinyl) ethyl] maleimide 2 chloride, screwdiazobenzidine, Hexamethylene di-isocyanate, toluene diisocyanate, hexamethylene JIISO thiocyanate, N,N'-ethylenebis maleimide, a N,N'-polymethylene screw iodoacetamide, The carbodiimide derivative by which 2, 4-dinitrobenzene sulfonate sodium salt, a diazo compound, or a condensation reagent is expressed with $RN=C=NR$ (or R'), N-hydroxy SUKUSHI imide, tri-n-butylamine, butylchloro FORUMETE, an isobutylisocyanide, etc. are mentioned.

[0042]As hydrogel, agarose, dextran, a kitchen, chitosan, The polysaccharide chosen from the group which consists of the carrageenin, hyaluronic acid, chondroitin sulfate, alginic acid, starch, and cellulose, or ones of these derivatives, And synthetic polycarboxylic acid, such as polyacrylic acid and polymethacrylic acid, Synthetic polycarboxylic acid amide, such as polyhydroxy alkyl carboxylate, such as poly HEMA, and polyacrylamide, Oligomer and polymer which have polyvinyl alcohol and ethylene glycol units, The hydrophilic polymer etc. which consist of a derivative of at least 1 compound chosen from polypeptides, such as polyglutamic acid, polyaspartic acid, gelatin, and collagen, and a dendrimer and/or this compound are mentioned. As for hydrogel, since a desired physiological active substance is fixed, it is preferred to be derivatized so that reactant groups, such as a hydroxyl group, carboxyl, amino ** aldehyde, carbonyl, epoxy, or a vinyl group, may be included.

[0043]As a physiological active substance fixed on the surface for biosensors of this invention, Especially if it interacts with a measuring object, will not be limited, but For example, immune proteins, Polypeptide or oligopeptide etc. which has a sugar chain which recognizes an enzyme, a microorganism, nucleic acid, a low molecule organic compound, non-immune proteins, immunoglobulin unity protein, sugar unity protein, and sugar, fatty acid, fatty acid ester, or ligand binding ability is mentioned.

[0044]As immune proteins, an antibody, hapten, etc. which use a measuring object as an antigen can be illustrated. As an antibody, various immunoglobulins, i.e., IgG, IgM, IgA, IgE, and IgD can be used. If a measuring object is a human serum albumin, specifically, an anti human serum albumin antibody can be used as an antibody. In using agricultural chemicals, an insecticide, methicillin resistant Staphylococcus aureus, an antibiotic, narcotics, cocaine, heroin, a crack, etc. as an antigen, For example, the antibody to O antigens 26, 86, 55, and 111, 157, etc., etc. can be used in an anti-Atrazine antibody, an anti-kanamycin antibody, an anti-methamphetamine antibody, or an E. coli bacillus.

[0045]As an enzyme, various enzymes, for example, redox enzyme, hydrolase, isomerase, lyase, synthetic enzyme, etc. can be used, without being especially limited, if activity is shown to the substance metabolized from a measuring object or a measuring object. If a measuring object is glucose and a measuring object is cholesterol

about glucose oxidase, specifically, cholesterol oxidase can be used. In using agricultural chemicals, an insecticide, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, an antibiotic, narcotics, cocaine, heroin, a crack, etc. as a measuring object, The substance and specific reaction which are metabolized from them are shown, for example, enzymes, such as acetylcholinesterase, catecholamine esterase, noradrenalin esterase, and dopamine esterase, can be used. [0046] Various microorganisms including *Escherichia coli* can be used especially as a microorganism, without being limited. As nucleic acid, the nucleic acid made into the object of measurement and the thing hybridized complementarily can be used. Both DNA (cDNA is included) and RNA can be used for nucleic acid. The kind in particular of DNA may not be limited but any of DNA of natural origin, the recombinant DNA prepared with gene modification technology, or chemosynthesis DNA may be sufficient as it. It is a compound which has a functional group which arbitrary compounds compoundable by the method of the usual Organic Chemistry Division composition as a low molecule organic compound are mentioned, and can be preferably combined via the linker compound [of the general formula I], direct, or cross-linking compound used by this invention.

[0047] Especially as non-immune proteins, avidin (streptoavidin), biotin, or a receptor can be used, for example, without being limited. As immunoglobulin unity protein, protein A or the protein G, a rheumatoid factor (RF), etc. can be used, for example. Lectin etc. are mentioned as sugar unity protein. As fatty acid or fatty acid ester, stearic acid, arachidic acid, behenic acid, stearic acid ethyl, ethyl arachidate, behenic acid ethyl, etc. are mentioned.

[0048] When physiological active substances are protein or nucleic acid, such as an antibody and an enzyme, the amino group of a physiological active substance, a thiol group, etc. can be used, and the immobilization can be performed by carrying out a covalent bond to the functional group of a surface of metal.

[0049] The surface for biosensors which had the physiological active substance fixed as mentioned above can be used as a measuring chip for biosensors for detection of the substance which interacts with the physiological active substance concerned, and/or measurement.

[0050] That is, according to this invention, the method of detecting and/or measuring the substance which interacts with the physiological active substance fixed by this surface for biosensors is provided by contacting an examined substance to this using the measuring chip for biosensors of this invention in which the physiological active substance was fixed. If it is considered as an examined substance, the sample containing the substance which interacts with the above-mentioned physiological active substance can be used.

[0051] It is preferred to detect and/or measure the interaction of the physiological active substance and examined substance which are fixed by the surface for biosensors with a non-electrochemical process in this invention. As a non-electrochemical process, surface-plasmon-resonance (SPR) measuring technique, crystal oscillator microbalance (QCM) measuring technique, the measuring technique that uses the functionalization surface from a golden colloidal particle to an ultrafine particle, etc. are mentioned.

[0052] According to the desirable mode of this invention, the measuring chip for biosensors of this invention can be used as a measuring chip for surface-plasmon-resonance biosensors, having the metal membrane arranged on a transparent base for example. With the measuring chip for surface-plasmon-resonance biosensors, It is a chip used for a surface-plasmon-resonance biosensor, the component containing the portion which penetrates and reflects the light irradiated from this sensor, and the portion which fixes a physiological active substance may be said, and it may adhere to the main part of this sensor, and desorbs.

[0053] A sample can be analyzed by the intensity of the monochromatic light in which glass etc. were optically reflected from the boundary of a transparent substance and metallic thin film layer depending the phenomenon of surface plasmon resonance on it being dependent on the refractive index of the sample in the metal's outgoing radiation side, and measuring the intensity of the monochromatic light reflected.

[0054]

[Working example] Although the following working examples explain this invention still more concretely, the range of this invention is not limited to these working examples.

Working example 1 : Production of the surface for bio sensor chips : (1) In addition to a thiol two functional groups. Production of the surface for biosensors using the SAM reagent [water-soluble]-glutathione which it has: 1 cm with a 50-nm golden vacuum evaporation film (after processing the cover glass which is 1 cm with a Model-208UV-ozone cleaning system (TECHNOVISION INC.) for 30 minutes) It dipped in the solution of 1mM glutathione (reduction type), and incubated at 25 °C for 18 hours. Then, 40 °C water washed 10 times for the chip surface.

[0055] (2) Production of the surface for biosensors with the compound (7-carboxy-1-heptanethiol) in which only one has a functional group as the comparative example 1 in addition to a thiol : 1 cm whose golden vacuum evaporation film is 50 nm (after processing the cover glass which is 1 cm with an ozone cleaner for 30 minutes) it dipped in the ethanol solution of the 7-carboxy-1-heptanethiol (said — Renhua — study) of 1mM, and the surface treatment was performed at 25 °C for 18 hours. Then, five ethanol, and ethanol/water mixed solvent washed, and the chip was washed once 5 times with water at 40 °C.

(3) As the comparative example 2, it dipped in the solution of L-cysteine (Wako Pure Chem) of 1mM, and the surface treatment of a golden vacuum evaporation film and washing were performed by the same method as processing by glutathione.

[0056]Working-example 2: The quality assessment of the surface for bio sensor chips: Each chip produced in working example 1 was installed on the cartridge block of a commercial surface-plasmon-resonance biosensor (beer core company make, BIAcore3000), and it experimented by the method of maker recommendation.

(1) Measurement of un-unique combination of the protein to the chip for measurement immobilization of un-unique combination of the protein to the chip for immobilization was performed as follows (the chip for immobilization was made to react to protein without an activator). It is more desirable for protein not to adsorb. Hazama casting and the amount of physical adsorption of protein A were measured [the produced chip] for 10mM acetic acid buffer solution (pH 4.5) of 40mg/ml of protein A as it was for 10 minutes. The amount of non-specific adsorption of Hazama casting and rabbit IgG was measured for the HBS buffer solution of pH 7 of 15 microg/ml rabbit IgG for 10 minutes. The rate of flow used a part for 10microL/. Respectively, the resonance signal of 10 minutes after (RU) was made into the index of physical adsorption.

[0057](2) Measurement of the measurement protein interaction of a protein interaction was performed as follows. 70micro of mixed liquor L of a 1-ethyl-2,3-dimethylaminopropylcarbodiimide (400mM) and N-hydroxysuccinimide (100mM) is slushed into a measuring cell for the chip for physiological active substance immobilization by 10micro of rates-of-flow L/min, Protein A was fixed to the chip by slushing 10mM acetic acid buffer solution solution (pH 4.5) of 40mg/ml of protein A for 30 minutes. Then, by 1M ethanolamine (pH 8) of 70microL, 10mM glycine and chloride buffer solution of 10microL (pH 2) were slushed into the measuring cell after decomposing unreacted components, and the fixed protein A was washed. Light intensity was measured for rabbit IgG diluted [ml] in 15 microg /to the measuring cell which fixed protein A with the sink for 10 minutes by a part for 10micro of rates-of-flow L/, and it was asked for the resonance signal. Resonance signal variation (RU) by protein A immobilization and united resonance signal variation (RU) of IgG were made into the desirable index.

[0058](3) The amount of physical adsorption of the ligand (protein A) of the chip surface which carried out the surface modification according to glutathione and 7-carboxy-1-heptanethiol and L-cysteine to the result table 1, The amount of immobilization by the covalent bond of ligand (protein A), the amount of specific bindings of analyte (rabbit IgG), and the nonspecific coupling amount of analyte (rabbit IgG) are shown.

[0059]

[Table 1]

表1. グルタチオン処理チップと 7-カルボキシ-1-ヘプタンチオールまたはL-システイン処理チップの比較

表面処理に用いた化合物	プロテイン A の物理吸着量 (RU)	アナライト(ウサギ IgG) の非特異結合量 (RU)	プロテイン A 固定化量 (RU)	ウサギ IgG 結合量 (RU)
グルタチオン (本発明)	-90.0	-80.0	851.0	5631
7-カルボキシ-1-ヘプタンチオール (比較例 1)	441.4	17.6	911.6	2350
L-システイン (比較例 2)	14.5	291.2	628.2	2771

[0060]The result of Table 1 shows that proteinic physical adsorption and a nonspecific combination decreased as compared with the 7-carboxy-1-heptanethiol and cysteine which are comparative examples by performing a surface treatment by glutathione. Although the amount of immobilization of the protein A fixed by the chip is comparable similarly by performing a surface treatment by glutathione, it turns out that the amount of immobilization of rabbit IgG acted as Kougami relatively. This result shows that the avidity of the protein A after immobilization was held relatively.

[0061]

[Effect of the Invention]By this invention, the surface of metal by glutathione, As compared with the surface treatment in 7-carboxy-1-heptanethiol or cysteine, almost all molecules have maintained activity for the physiological active substance. It is a means for fixing, and un-***** physical adsorption and un-unique combination could be reduced, without dropping out, and it became possible to provide the method that a processing process is simple and it is reliable.

[Translation done.]